

**KOPI****PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation 6 :</b> <b>C12N 15/10, 9/24, C12Q 1/68, C12P 19/34</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/20922</b>  <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 12. Juni 1997 (12.06.97)</b>
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP96/05398 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 4. December 1996 (04.12.96)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 195 45 320.4      5. December 1995 (05.12.95)      DE  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; D-68298 Mannheim (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> SOBEK, Harald [DE/DE]; Birkenstrasse 29, D-82377 Penzberg (DE). SCHMIDT, Manfred [DE/DE]; Waxensteinstrasse 27, D-82377 Penzberg (DE). FREY, Bruno [DE/DE]; Hochfeldstrasse 50, D-82377 Penzberg (DE). KALUZA, Klaus [DE/DE]; Hochfeldanger 3, D-83670 Bad Heilbrunn (DE).  <b>(74) Gemeinsamer Vertreter:</b> BOEHRINGER MANNHEIM GMBH; Patentabteilung, D-68298 Mannheim (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO Patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
<b>(54) Title:</b> THERMOLABILE URACIL-DNA-GLYCOSYLASE, PROCESS FOR ITS PREPARATION AND USE FOR REMOVING URACIL FROM DNA  <b>(54) Bezeichnung:</b> THERMOLABILE URACIL-DNA-GLYKOSYLASE, VERFAHREN ZU DEREN HERSTELLUNG UND VERWENDUNG ZUR ENTFERNUNG VON URACIL AUS DNA  <b>(57) Abstract</b> <p>The invention concerns a thermolabile enzyme having uracil-DNA-glycosylase activity and characterized in particular by a high degree of purity, short half-life times and a content of less than 2 % contaminating foreign activities. The invention further concerns a process for preparing this enzyme and its use for removing the base uracil from DNA, in particular uracil-containing PCR products. The enzyme can be obtained from Gram-positive microorganisms such as, for example, Arthrobacter or Micrococcus.</p> <b>(57) Zusammenfassung</b> <p>Thermolabiles Enzym mit Uracil-DNA-Glykosylase-Aktivität, das sich insbesondere durch einen hohen Reinheitsgrad, kurze Halbwertszeiten und einen Gehalt an Kontaminierenden Fremdaktivitäten von weniger als 2 % auszeichnet, ein Verfahren zu dessen Gewinnung sowie dessen Verwendung zur Entfernung der Base Uracil aus DNA, insbesondere uracilhaltiger PCR-Produkte. Das Enzym ist aus Gram-positiven Mikroorganismen wie z.B. Arthrobacter oder Micrococcus erhältlich.</p>		

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LJ	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

**Thermolabile Uracil-DNA-Glykosylase, Verfahren zu deren Herstellung und Verwendung zur Entfernung von Uracil aus DNA**

Die Erfindung betrifft ein thermolabiles (hitzelabiles) Enzym mit Uracil-DNA-Glykosylase-Aktivität, ein Verfahren zur Gewinnung des Enzyms aus Gramm-positiven Mikroorganismen sowie ein verbessertes Verfahren zum Nachweis bzw. Entfernung von Uracil aus uracilhaltiger DNA, insbesondere aus DNA-Fragmenten, die nach spezifischer Amplifikation (z.B. PCR) erhalten werden.

Uracil-DNA-Glykosylasen (UNG; EC 3.2.2.3) sind weit verbreitete, hochkonservierte und extrem spezifische DNA-Reparaturenzyme. Ihre biologische Funktion ist die spezifische Entfernung der Base Uracil aus DNA. Uracil kann in DNA durch die spontane Deaminierung von Cytosin, oder durch die Mißincorporation von dUTP während der DNA-Synthese entstehen. Deaminierung von Cytosin führt zu promutagenen U:G Falschpaarungen, die, wenn sie nicht korrigiert werden, zu Transitions-Mutationen in der nächsten Runde der DNA-Synthese führen (Lindahl, T. (1993) Nature 362, 709-715).

UNGs werden insbesondere im Rahmen der PCR-Technologie bei der Dekontaminierung von PCR-Ansätzen verwendet. Die sogenannte "carry-over"-Kontaminierung von PCR-Ansätzen durch amplifizierte Target-DNA kann zu falsch-positiven Resultaten führen. Die "carry-over"-Kontaminierung kann durch den Einbau von dUTP in alle PCR-Produkte (wobei dTTP durch dUTP ersetzt wird) und die Behandlung von fertig gemixten PCR-Reaktionen mit UNG, gefolgt von thermischer Inaktivierung der UNG, kontrolliert werden. UNG spaltet dabei Uracil aus allen uracilhaltigen DNAs, hat jedoch keinen Effekt auf natürliche (d.h. Ziel-)DNA. Die entstehenden abasischen Stellen blockieren die Replikation der DNA durch DNA-Polymerasen. Durch diese "carry-over-prevention"-Technologie kann verhindert werden, daß PCR-Produkte aus resultierenden PCRs durch Kontamination zu falsch-positiven Resultaten führen können (Longo et al. (1990) Gene 93, 125-128). Für diese Methode wird heute in der Regel eine UNG aus E. coli verwendet (WO 92/0181, EP 0 415 755). Auch die entsprechende Verwendung von UNGs für die isothermale Amplifikation ist beschrieben (EP 0 624 643).

Die meisten heute bekannten UNGs zeigen eine ausreichend hohe Spezifität für die effiziente Spaltung von Uracil aus Einzel- und Doppelstrang-DNA und sind somit prinzipiell zur Optimierung spezifischer Amplifikationsverfahren verwendbar. Die UNGs zeigen

dagegen keine Aktivität gegenüber anderen, "normalen" DNA-Basen oder gegenüber Uracil in RNA.

Eine Reihe von UNGs, isoliert aus prokaryotischen und eukaryotischen Organismen sowie einige viralen Ursprungs, sind beschrieben. Mikrobielle UNGs sind insbesondere aus *E. coli* (T. Lindahl, PNAS 71 (9), 3649-3653 (1974); Lindahl et al., J. Biol. Chem. 252 (10), 3286-3294 (1977)), *Bacillus subtilis* (Cone et al., Biochemistry 16 (14), 3194-3201 (1977)), *Bacillus stearothermophilus* (Kaboev et al., FEBS Letters 132 (2), 337-340 (1981)), *Thermothrix thiopara* (Kaboev et al., J. Bacteriology 164 (1), 421-424 (1985)) und *Micrococcus luteus* (Leblanc et al., J. Biol. Chem. 257 (7), 3477-3483 (1982)) bekannt. Darüber hinaus sind eine UNG vom Menschen (Krokan et al., Nucl. Acid Res. 9 (11), 2599-2613 (1981)) und einige UNGs viralen Ursprungs beschrieben. Des weiteren ist die strukturelle Basis für die Spezifität und Katalyse der UNG seit kurzem geklärt (Savva et al., Nature 373, 487-493 (1995); Mol et al., Cell 80, 869-878 (1995)).

Für die Anwendung für die "carry-over-prevention"-Methode im Rahmen von Amplifikationsverfahren, wie z.B. der PCR, genügen die meisten UNGs jedoch aufgrund ihres mangelnden Reinheitsgrads bzw. anderer Eigenschaften, insbesondere zu geringer Thermolabilität nicht den Anforderungen. So wird selbst nach drastischer Hitzeeinwirkung, wie beispielsweise 10 Minuten, 95°C und anschließender PCR eine Restaktivität an UNG nachgewiesen (Thornton et al., BioTechniques 13 (2), 180-183 (1992)). Die Restaktivität an UNG, d.h. der weitere Abbau von uracilhaltigen PCR-Produkten wird routinemäßig in der Regel dadurch verhindert, daß die entsprechenden Ansätze nach der PCR-Reaktion bei hohen Temperaturen von ca. 70° bis 72°C weiter inkubiert werden. Zudem wurde beobachtet, daß die Lagerung des PCR-Ansatzes/des PCR-Produkts selbst bei ca. 4°C oft zum weiteren Abbau des PCR-Produktes führt. Daher werden weit tiefere Temperaturen, wie ca. -20°C, für die Lagerung und/oder die Inhibierung der Restaktivität von UNG durch den Zusatz von Chloroform oder Phenol empfohlen. Darüber hinaus führte die Suche nach besser geeigneten hitzelabilen Mutanten bisher nicht zum Ziel (Duncan et al., J. Bacteriology 134, (3), 1039-1045 (1978); WO 92/0181).

Somit läßt sich die Aktivität der derzeit zur Verfügung stehenden UNGs nicht vollständig bzw. nur unter Anwendung zusätzlicher, das gesamte Verfahren zusätzlich komplizierender Maßnahmen ausschalten.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war somit, ein Enzym mit Uracil-DNA-Glykosylase-Aktivität zur Verfügung zu stellen, durch die die aus dem Stand der Technik bekannten Schwierigkeiten bei der Entfernung von Uracil aus DNA weitestgehend ausgeräumt bzw. vermieden werden können.

Die Aufgabe wird gelöst durch ein thermolabiles Enzym mit Uracil-DNA-Glykosylase-Aktivität, welches aus Gramm-positiven Mikroorganismen mit einem Reinheitsgrad von mindestens 95% (SDS-Gel) erhältlich ist und durch eine Halbwertszeit von weniger als 5 Minuten bei 40°C und ungefähr oder weniger als 2 Minuten bei 45°C charakterisiert ist. Neben *Arthrobacter* kommen hier insbesondere Mikroorganismen der Gattung *Micrococcus* in Betracht. Besonders vorteilhaft hat sich erwiesen, wenn der Mikroorganismus DSM 10239 (BMTU 3346) als Enzymquelle verwendet wird. DSM 10239 ist bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig hinterlegt.

Die Reinigung des erfindungsgemäßen Enzyms erfolgt in der Regel unterhalb von ca. 10°C, vorteilhafterweise bei ca. 4°C. Zunächst werden die Zellen durch dem Fachmann bekannte Maßnahmen aufgeschlossen; bevorzugt geschieht dies mechanisch mittels einer Hochdruckpresse oder eines Homogenisators. Anschließend werden die DNA-Bestandteile abgetrennt, z.B. durch eine Polymyxin-Fällung. Der Überstand wird zur weiteren Reinigung zunächst einer Hydroxyapatit-Chromatographie (z.B. Hydroxyapatit-Ultrogel) unterzogen, der eine Anionenaustauschchromatographie (bevorzugt an Q-Sepharose ff high load) und eine hydrophobe Interaktionschromatographie folgt. Letztere kann z.B. an Phenyl-Sepharose ff stattfinden.

Im einzelnen wird für die Reinigung des Enzyms wie folgt vorgegangen:

Eine bestimmte Menge Zellen werden in Form ihres Trockengewichts in gefrorenem Zustand mit einer niedrig konzentrierten, im pH-Bereich von ca. 7,2 bis 8,0 gut puffernden Substanz, wie z.B. Phosphatpuffer mit einem SH-Reagenz suspendiert. Anschließend erfolgt zum Aufschluß der Zellen eine Inkubation mit Lysozym; in der Regel sind hier 30 Minuten bei ca. 4°C ausreichend. Der eigentliche Zellaufschluß erfolgt mechanisch, beispielsweise mittels einer Hochdruckpresse oder eines Homogenisators. In der Regel wird ein Aufschlußgrad von ca. 30% erreicht.

Zur Abtrennung von Nukleinsäurebestandteilen werden diese unter nicht denaturierenden Bedingungen gefällt. Insbesondere hat sich hier eine stufenweise Fällung mit einer verdünnten Polymyxin-Lösung als geeignet erwiesen. Nach kurzer Inkubationsphase und Zentrifugation wird der Überstand vorteilhafterweise gegen die Pufferlösung dialysiert, die für die Suspensierung der Biomasse verwendet worden ist. Es hat sich gezeigt, daß die Dialyse in der Regel nach ca. 16 Stunden abgeschlossen ist. Das Dialysat wird über eine Hydroxyapatit-Ultrogelsäule aufgetrennt. In jedem Fall wird das entsprechende Chromatographie-Material zunächst mit der Lösung, in der sich auch die aufzutrennende Fraktion befindet, äquilibriert. Die das Enzym enthaltene Fraktion wird mit einem linearen Gradienten von ca. 10 mM bis 1 M Pufferlösung, z.B. eines Phosphatpuffers bei ca. pH 7,5 eluiert. Die vereinigten Fraktionen werden gegen eine bei ca. pH 8,0 puffernde

Lösung dialysiert. Als Puffer ist hier beispielsweise Tris/HCl, aber auch Triethanolamine, N-Methyldiethanolamine oder andere organische bzw. anorganische Puffer mit einer Pufferkapazität zwischen pH 7,8 bis 8,4 geeignet. Das vereinigte Dialysat wird auf eine mit dem Dialysat-Puffer äquilibrierte Anionenaustauschersäule, wie beispielsweise Q-Sepharose ff high load aufgetragen und mit einem linearen Gradienten mit steigenden Konzentrationen Natriumchlorid eluiert. Die vereinigten Eluatfraktionen werden mit Ammoniumsulfat versetzt (Endkonzentration: 1,3 M) und auf ein hydrophobes Säulenmaterial aufgetragen. Als Säulenmaterial hat sich hier besonders Phenylsepharose ff als geeignet erwiesen. Das Säulenmaterial wird mit Puffer, beispielsweise Kaliumphosphat-Puffer enthaltend zusätzlich insbesondere ca. 1 M Ammoniumsulfat äquilibriert. Nach Beladung des Säulenmaterials wird mit einem linearen Gradienten enthaltend steigende Mengen an Glycerin bei pH ca. 6,0 eluiert. Die entsprechende Enzymaktivität aufweisenden Fraktionen werden vereinigt und gegen ein geeignetes Puffersystem, welches mindestens 100 mM Natriumchlorid und mindestens 40% Glycerin enthält dialysiert. Dieser Dialysepuffer hat sich gleichfalls als Lagerpuffer für das Enzym als geeignet erwiesen, wenn die Mischung aus ca. 10 bis 250 mM einer im schwach alkalischen pH-Bereich puffernder Substanz, wie beispielsweise Hepes, Tris oder Triethanolamin, ca. 0,1 bis 5 mM eines organischen Komplexbildners wie beispielsweise EDTA, eines SH-Gruppen stabilisierenden bzw. SS-Gruppen reduzierenden Agenzes in einer Konzentration von ca. 0,5 bis 5,0 mM, 200 bis 350 mM Natriumchlorid und ca. 45 bis 55% Glycerin aufweist. Als ganz besonders vorteilhaft für die Lagerung hat sich eine entsprechende Mischung erwiesen, die ca. 300 mM Natriumchlorid sowie ca. 50% (v/v) Glycerin sowie gegebenenfalls ca. 0,1 bis 5,0 mg/ml Rinderserumalbumin enthält. Das UNG-Enzym kann in einem solchen Puffer zwischen ca. +4° und -20°C bis zu einem Jahr aufbewahrt werden, ohne daß ein merklicher Aktivitätsverlust festzustellen ist.

Das Enzym kann mit dem erfindungsgemäßen Verfahren mit einem Reinheitsgrad von mindestens 95% (SDS-PAGE) erhalten werden. Das auf diese Weise isolierte Enzym besitzt mindestens eine spezifische Aktivität von  $5 \times 10^4$  Units/mg bei einem Temperaturoptimum von ca. 37 °C und einem pH-Optimum von ca. pH 6.5. Das apparente Molekulargewicht des Enzyms liegt zwischen 23000 und 24000, bei ca. 23400 dalton (SDS-PAGE).

Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Enzyms ist, daß es nahezu frei von Fremdaktivitäten ist. D.h. es konnte gezeigt werden, daß bezogen auf die Gesamtaktivität der UNG weniger als 2%, in vielen Fällen weniger als 0,1% von fremden Enzymaktivitäten enthalten sind. Insbesondere Aktivitäten der folgenden Enzyme konnten nicht festgestellt werden: DNasen, Nicking Aktivität, Einzelstrang-DNasen, RNasen und Exonukleasen.

Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen UNG-Enzyms ist seine geringe Hitzebeständigkeit. Bei ca. 40°C beträgt die Halbwertszeit des Enzyms weniger als 5 Minuten,

während einer Inkubation von ca. 45°C konnte eine Halbwertszeit von ungefähr 2 Minuten oder weniger, oft von ca. 60 Sekunden oder weniger ermittelt werden. Diese Stabilitätsdaten wurden in Tris/HCl-Puffer (pH-Bereich 8,3 bis 8,9), der darüber hinaus Magnesiumchlorid und Kaliumchlorid enthält, bestimmt.

Die erfindungsgemäße UNG ist zum Nachweis uracilhaltiger DNA bzw. zur Entfernung der Base Uracil aus DNA, insbesondere von uracilhaltigen PCR-Produkten geeignet. Die UNG wird hierfür in einem zwischen pH 7,5 und pH 9,2 puffernden System vorgelegt. Insbesondere haben sich hier solche Puffersysteme als geeignet erwiesen, die dem Fachmann für die Anwendung der PCR bekannt sind (Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Insbesondere haben sich hier anorganische oder organische Puffer, wie beispielsweise Tris-HCl in einem Konzentrationsbereich von 5 bis 100 mM, die zudem über 30 mM Kaliumchlorid und ca. 0,5 bis 3 mM Magnesiumchlorid enthalten, als vorteilhaft erwiesen. Die UNG liegt vorteilhafterweise in einer Konzentration von ca. 5 bis 40 U/ml, besonders bevorzugt von ca. 20 U/ml vor. Eine Inkubation von ca. eine bis 30 Minuten bei einer Temperatur von ca. 10°C bis 30°C hat sich in den meisten Fällen für den Abbau von kontaminierender uracilhaltiger DNA als ausreichend erwiesen. Anschließend wird die UNG inaktiviert, indem zwischen ca. 1 und 10 Minuten, vorteilhafterweise ca. 2 Minuten, auf ca. 95°C erhitzt wird. Als vorteilhaft hat sich dabei erwiesen, daß die erfindungsgemäße UNG nach der Inaktivierung bei längerer Inkubation (ca. 4°C) von mehreren Stunden (ca. 4h) keine Restaktivität aufweist. Diese Eigenschaft hat sich als besonders vorteilhaft in der sogenannten "carry-over-prevention"-Methode erwiesen, da die bekannten UNGs, wie z.B. das aus *E. coli* erhältliche Enzym, weniger leicht durch Hitzeeinwirkung zu inaktivieren sind und somit eine deutlich höhere Restaktivität zurück bleibt. Durch die Anwesenheit einer geringeren Restaktivität nach der Behandlung von DNA, beispielsweise PCR-Produkten, mit dem erfindungsgemäßen Enzym ist zudem der Vorteil der besseren bzw. längeren Lagerbarkeit verbunden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Kit (Reagenz) zur Vervielfältigung spezifischer Nukleinsäurefragmente, insbesondere zur Durchführung von PCR unter den beschriebenen verbesserten carry-over-prevention-Bedingungen. Der Kit enthält neben den konventionellen Nukleotidtriphosphaten das Nukleotidtriphosphat dUTP, eine thermostabile Polymerase, die erfindungsgemäße hitzelabile UNG sowie einen geeigneten Reaktionspuffer. Im besonderen enthält dieser Kit die hitzelabile UNG, in einer Konzentration von 0,1 bis 5 U/ $\mu$ l. Daneben enthält der Kit die Nukleotidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP in einer Konzentration von 10 mM sowie das Nukleotidtriphosphat dUTP in einer Konzentration von 30 mM. Des weiteren enthält der Kit einen Puffer zur Durchführung der Dekontamination, Hitzeinaktivierung der UNG und PCR. Dieser Puffer ist im schwach-alkalischen Bereich gepuffert, zwischen pH 7,5 und 9,2, vorzugsweise pH 8,3 bis 8,9. Geeignete Puffersubstanzen sind dabei beispielsweise Tris/HCl 10 mM. Ferner

enthält der Puffer ca. 10 bis 100 mM KCl (bevorzugt sind 50 mM),  $MgCl_2$  zwischen 1,0 und 5 mM. Die bevorzugt verwendete Polymerase ist Taq-DNA-Polymerase, isoliert aus *Thermus aquaticus*; die Konzentration beträgt 2 bis 10 U/ $\mu$ l, bevorzugt 5 U/ $\mu$ l.

Zusammenfassend kann somit festgehalten werden, daß das erfindungsgemäße hitzelabile Enzym mit Uracil-DNA-Glykosylase-Aktivität im Vergleich zu bekannten Enzymen überraschenderweise leichter durch Hitzebehandlung zu inaktivieren ist. Zudem konnte gezeigt werden, daß die Verwendung des erfindungsgemäßen Enzyms bei der "carry-over-prevention"-Methode eine deutlich geringere Restaktivität nach Durchführung der PCR zeigt. Dies führt zu einer deutlichen Verbesserung bezüglich Quantität und Qualität des PCR-Produktes; insbesondere da uracilhaltige PCR-Produkte nach der PCR nicht aufgrund von Restaktivität (und/oder Reaktivierung) der UNG degradiert werden.

Erläuterungen der Abbildungen:

Abbildung 1:

Vergleich Hitzeinaktivierung der UNG aus DSM 10239 und *E. coli*.

Es wurden jeweils 1 U der UNG aus DSM 10239 und *E. coli* in 100  $\mu$ l PCR-Puffer verdünnt und bei 40 und 45°C inkubiert. Zu bestimmten Zeiten wurden Proben genommen und die verbleibende Restaktivität bestimmt,

(-▲ (40°C), -■ (45°C): UNG DSM 10239;  
-△ (40°C), -□ (45°C): UNG *E. coli*).

Abbildung 2A:

Bestimmung der Restaktivität von UNG nach Inaktivierung und PCR.

Es wurden jeweils 2 U der UNG aus DSM 10239 sowie aus *E. coli* zu einem PCR-Ansatz zugegeben. Danach wurde die UNG für 2 min bei 95°C inaktiviert. Anschließend wurde die PCR (Amplifikation mit einem 103 Basenpaare langen Fragment) durchgeführt. Nach der PCR wurde die Probe auf 4°C abgekühlt. Die Spuren A 1-4 zeigen den Versuch des Ansatzes für die UNG aus DSM 10239. Die Spuren B 1-4 zeigen den entsprechenden Versuch für die UNG aus *E. coli*, die Spuren C 1-4 die Kontrollansätze ohne UNG. Die Spuren A1, B1, C1 zeigen die Probe für eine Inkubationszeit  $T = 0$ ; die Spuren A2, B2, C2 die Probe nach einer Inkubationszeit  $T = 1$  h; die Spuren A3, B3, C3 nach 4 h Inkubation und die Spuren A4, B4, C4 nach 16 h Inkubation. Nach 16 h zeigen sich bei beiden UNGs Abbauprodukte des PCR-Produktes. Bei der UNG aus *E. coli* ist das Auftreten solcher Abbauprodukte bereits zur Zeit  $T = 0$  zu beobachten. Die Spuren D und



E zeigen den Verlauf des Abbaus der PCR-Produkte bei Zugabe der UNG aus DSM 10239 (Spur D) und E. coli (Spur E) nach der PCR.

Abbildung 2B:

Versuchsanordnung wie in Abb. 2A; die Inaktivierungszeit der UNG betrug jedoch 10 min bei 95°C. Die Spuren A, B entsprechen den Spuren A, B der Abb. 2A. Es ist deutlich zu erkennen, daß die UNG aus DSM 10239 im Bereich zwischen T = 0 und T = 4 h keinerlei Abbauprodukte des PCR-Fragmentes aufweist.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter:

Beispiel 1:

Reinigung der hitzelabilen Uracil-DNA-Glykosylase

Definition der Enzymeinheiten:

1 U ist definiert als die Menge von Uracil-DNA-Glykosylase, die benötigt wird, um 1 µg Einzelstrang uracilhaltige DNA (Bakteriophage M13, gewachsen in E. coli CJ236 DUT negativ, UNG negativ) bei 37°C in 60 min vollständig abzubauen.

Testvolumen: 50 µl, Konzentration 60 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,1 mg/ml BSA.

Nach Inkubation für 60 min bei 37°C werden 16,5 µl 0,6 M NaOH zugegeben, für 5 min bei 37°C inkubiert, danach auf Eis abgestoppt und anschließend 16,5 µl 0,6 M HCl zugegeben. Die Auswertung erfolgt auf einem 1% igen Agarosegel.

Reinigung:

Die Reinigung der Uracil-DNA-Glykosylase erfolgt bei 4°C. Das hier beschriebene Verfahren bezieht sich auf die Reinigung der Uracil-Glykosylase aus DSM 10239.

Das Reinigungsverfahren umfaßt folgende Schritte:

Aufschluß der Zellen in einer Hochdruckpresse, Polymmin-Fällung zur Abtrennung der DNA, Reinigung der UNG durch Chromatographie an HA-Ultrogel, Anionenaustauschchromatographie (Q-Sepharose ff high load) und hydrophobe Interaktionschromatographie (Phenyl-Sepharose ff).

**Lösungen:**

- Puffer 1:** 10 mM Kaliumphosphat, pH 7,5, 1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol
- Puffer 2:** 10 mM Tris/HCl, pH 8,0/4°C, 1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol
- Puffer 3:** 100 mM Kaliumphosphat, pH 6,0, 1 M Ammoniumsulfat, 1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol
- Puffer 4:** 100 mM Kaliumphosphat, pH 6,0, 10% Glycerin, 1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol
- Lagerpuffer:** 50 mM Hepes/KOH, pH 8,0, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 300 mM NaCl, 50% Glycerin

40 g Biomasse (Trockengewicht) werden mit 400 ml Puffer 1 versetzt, aufgetaut und suspendiert. Die Suspension wird mit 100 mg Lysozym versetzt und für 30 min bei 4°C gerührt. Anschließend erfolgt der Aufschluß der Zellen in einer Hochdruckpresse in zwei Durchgängen. Der Druck beträgt dabei 550 kg/cm<sup>2</sup>. Der Aufschlußgrad beträgt unter diesen Bedingungen üblicherweise 20-30%.

Anschließend erfolgt eine Polyminfällung: 10 ml 10%ige Polymin-P-Lösung werden tropfenweise zugegeben. Falls die Fällung nicht vollständig ist, erfolgt eine weitere Polymin-Zugabe in je 2 ml-Schritten. Nach beendeter Titration wird das Präzipitat ca. 30 min bei 4°C stehen gelassen. Anschließend wird die Suspension für 30 min bei 13.000 x g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand der Zentrifugation wird insgesamt gegen 5 x 5 Liter Puffer 1 dialysiert (Dauer 16 h). Das Dialysat wird auf eine mit Puffer 1 äquilibrierte HA-Ultrogelsäule (2,6 x 10 cm) aufgezogen und mit ca. 500 ml Puffer 1 gewaschen. Anschließend wird das Enzym mit einem linearen Gradienten aus Puffer 1 und Puffer 1 + 1 M Kaliumphosphat pH 7,5 in einem Gesamtvolumen von 1,5 l eluiert.

Die Fließgeschwindigkeit beträgt 5 ml pro Minute, die Fraktionsgröße 10 ml pro Fraktion.

Das Enzym eluiert zwischen 50 und 150 mM Kaliumphosphat. Die gepoolten Lösungen werden gegen 4 x 2 Liter Puffer 2 dialysiert. Die dialysierte Lösung wird auf eine mit Puffer 2 äquilibrierte Q-Sepharose ff-high load (2,6 x 10 cm) aufgezogen und mit ca. 500 ml Puffer 2 die Säule gewaschen.

Anschließend wird das Enzym mit einem linearen Gradienten aus Puffer 2 und Puffer 2 + 1 M NaCl in einem Gesamtvolumen von 1,5 Liter eluiert. Fließgeschwindigkeit beträgt ca. 10,0 ml/min, die Fraktionsgröße 10 ml.

Das Enzym eluiert zwischen 200 und 300 mM NaCl-Konzentration.

Zu den gepoolten Fraktionen wird festes Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 1,3 M unter Rühren bei 4°C zugegeben und gelöst. Diese Lösung wird auf eine mit Puffer 3 äquilibrierte Phenylsepharose 6B-Säule (1,6 x 10 cm) geladen. Nach Waschen mit ca. 200 ml Puffer 3 wird das Enzym mit einem linearen Gradienten aus Puffer 3 und Puffer 4 in einem Volumen von 100 ml eluiert. Die Fließgeschwindigkeit beträgt ca. 2,5 ml pro min, die Fraktionsgröße 4 ml. Die aktiven Fraktionen werden vereinigt und gegen Lagerpuffer dialysiert. Die gereinigte UNG ist zwischen +4°C und -20°C in Lagerpuffer stabil.

Die beschriebene Methode liefert eine ca. 23,4 kDa große Uracil-DNA-Glykosylase mit einem Reinheitsgrad von mindestens 95 % (8-25% SDS-PAGE, Phastgel von Pharmacia, Phastgelsystem) und einer spezifischen Aktivität von mindestens  $5 \times 10^4$  Units/mg (Proteinbestimmung nach Coomassie). Das Enzym ist zudem frei von kontaminierenden Fremdaktivitäten (Nicking-Aktivität, Exonuklease und Endonuklease).

**Bestimmung von kontaminierenden Fremdaktivitäten:**

Der Test auf das Vorhandensein von kontaminierenden Fremdenzymaktivitäten wurde in einer Lösung bestehend aus 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTE durchgeführt. Die einzelnen Enzymfraktionen (20 µl) wurden mit den entsprechenden Nukleinsäuren inkubiert. Sogenannte Nicking-Aktivität wurde durch Inkubation von 1 µg pBR322 für 16 Stunden bei 37°C bestimmt. Einzel- und doppelsträngige Nukleasen wurden unter Verwendung von M13mp9-ss DNA und entsprechend von λ/Eco RI, HindII getestet; die Inkubation erfolgte bei 37°C für 16 Stunden. Die Abwesenheit von RNasen wurde getestet durch Inkubieren der Proben mit 5 µg MS 2 RNA für 1 Stunde bei 37°C. Für den Test auf Exonukleasen wurden die Proben mit 1 µg [<sup>3</sup>H]-gelabelter DNA 4 Stunden bei 37°C inkubiert und die freigesetzten [<sup>3</sup>H]-markierten Nukleotide bestimmt.

### Beispiel 2:

#### Hitzelabilität der UNG

Die Hitzelabilität (Hitzeinaktivierbarkeit) der UNG aus DSM 10239 wurde mit einem radioaktiven Testsystem bestimmt.

Zu diesem Zweck wurde ein radioaktives Testsubstrat über Random primed labeling hergestellt. 5 ml Reaktionsvolumen enthielten: 2,5 mg Kalbsthymus-DNA, je 0,5  $\mu$ M dCTP, dATP, dGTP, 2,6 nM H<sup>3</sup>-dUTP, 23 nM dUTP, 1 ml Hexanukleotidmix (62,5 OD/ml) und 5 KU Klenow-Fragment. Der Reaktionsansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert. Nicht eingebaute Nukleotide wurden durch Chromatographie an Sephadex G50 (2,5 x 10 cm) abgetrennt (Sephadex G50, äquilibriert in 10 mM Tris/HCl, pH 8,0/4°C). Die Fraktionen, die markierte DNA enthielten, wurden gesammelt und durch Lyophilisation eingengt.

#### Durchführung des Testes:

Der Testansatz (50  $\mu$ l) enthielt 5  $\mu$ l der markierten Kalbsthymus-DNA (10.000 cpm entspricht 0,82 pMol H<sup>3</sup>-Uracil), 60 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,1 mg/ml BSA. Nach Zugabe von UNG in einer geeigneten Verdünnung wurde der Reaktionsansatz für 10 min bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurde auf Eis abgestoppt, 100  $\mu$ l Fällungs-DNA (1 mg/ml) zugegeben und 300  $\mu$ l 10%ige Trichloressigsäure (TCA) zugegeben. Nach 10 min Inkubation auf Eis (4°C) wurde für 5 min in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, 400  $\mu$ l des Überstandes wurden zur Zählung in einem Szintillationszähler verwendet.

Im Rahmen der "carry-over-prevention"-Methode wird UNG in einem für PCR geeigneten Puffer verwendet. Die Inaktivierungskinetik der erfindungsgemäßen UNG wurde deshalb in einem für PCR geeigneten Puffer durchgeführt. Der PCR-Puffer enthielt 10 mM Tris/HCl, pH 8,3, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl.

1 U UNG wurde in 100  $\mu$ l PCR-Puffer verdünnt und bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert. Zu bestimmten Zeiten wurden Proben genommen und die verbleibende Restaktivität mit dem oben beschriebenen Testsystem bestimmt (Tabelle 1). Dabei wurde die erfindungsgemäße UNG folgende Halbwertszeiten ermittelt: 0,5 min bei 45°C, 2 min bei 40°C (Abb. 1). Für die UNG aus E. coli wurden unter entsprechenden Bedingungen folgende Halbwertszeiten ermittelt: 8 min bei 45°C und 27 min bei 40°C.

Tabelle 1:

Zeit [min]	UNG DSM 10239 (40°C)	UNG DSM 10239 (45°C)	UNG E. coli (40°C)	UNG E. coli (45°C)
0	100%	100%	100%	100%
2	82%	3%	89%	65%
5	12%		82%	45%
10	2%		76%	42%
20				
30			50%	10%
60			18%	2%

Beispiel 3:Restaktivität der erfindungsgemäßen UNG nach Inaktivierung und PCR

Das im folgenden beschriebene System dient zum Nachweis von Restaktivitäten an UNG nach Hitzeinaktivierung und anschließender PCR. Dabei wird der Abbau eines uracilhaltigen PCR-Produkts verfolgt. Die Detektion des PCR-Produkts erfolgt über den Nachweis einer eingebauten Digoxigenin (DIG)-Markierung. Diese Markierung wurde durch Verwendung eines am 5'-Ende DIG-markierten Primers in der PCR vorgenommen; der zweite Primer trägt keine Markierung. Der Abbau des uracilhaltigen PCR-Produkts erfolgt durch den Nachweis der Abbauprodukte. Die Abbauprodukte werden dabei über ein Sequenzgel aufgetrennt und die DIG-Markierung über ein Anti-DIG/Chemolumineszenz-System detektiert.

Es wurde eine 103 Basenpaare lange Sequenz aus dem Multiple Cloning Site des pUC 18-Vectors amplifiziert. Als Primer wurden dazu der pUC-sequencing, 5'-Digoxigenin-markierte Primer (Sequenz: 5'-DIG-d[GTAAAACGA CGGCCAGT]-3' sowie der pUC-reverse sequencing primer (Sequenz: d[CAGGAAAC AGCTATGAC]-3' verwendet. 100 µl des Ansatzes enthielten PCR-Puffer mit 10 mM Tris/CCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, je 200 µM der Nukleotide dATP, dCTP, dGTP sowie 600 µM dUTP, 2,5 U Taq-DNA-Polymerase, 1 ng pUC18-DNA/Pst 1, 2 U UNG sowie je 1 µM der beiden Primer. Danach werden die Proben in einen Thermocycler (z.B. Perkin Elmer 9600) überführt. Die Hitzeinaktivierung der UNG erfolgt innerhalb von 2-10 min bei 95°C. Anschließend wird die PCR zur Amplifikation des 103 Basenpaare-Fragments durchgeführt. Die PCR besteht aus 25 Zyklen á 1 min bei 94°C, 1 min bei 50°C sowie 3 min bei 72°C. Danach wird die Probe bei 4°C aufbewahrt und zu geeigneten Zeitpunkten Proben entnommen, um den Abbau des PCR-Produkts nachzuweisen. 20 µl der entsprechenden Probe werden mit 5 µl 0,6 M NaOH versetzt, für 5 min bei 37°C inkubiert, danach auf Eis abgestoppt

und anschließend 5 µl 0,6 M HCl sowie 4 µl Formamid-Stopper-Lösung zugegeben. Anschließend werden die Proben 3 min bei 95°C erhitzt, um Einzelstränge zu erhalten.

1,5 µl der Probe werden auf ein 8%iges Sequenzgel aufgetragen und getrennt (Laufzeit 50 min bei 2500 V, 26 mA). Die anschließende Detektion des DIG-markierten PCR-Produkts sowie der DIG-markierten Abbauprodukte erfolgte nach dem Protokoll des DIG Taq DNA Sequencing Kit (Boehringer Mannheim) und des DIG-Lumineszenz-Detektions-Kit (Boehringer Mannheim).

Abb. 2A zeigt die Auswertung eines solchen Experiments. Dabei wurden die PCR-Ansätze bei 4°C aufbewahrt und nach 0 h, 1 h, 4 h, 16 h jeweils Proben entnommen.

Im Vergleich zu der UNG aus DSM 10239 (Spur A 1-4) wurde die UNG aus *E. coli* (Spur B 1-4) eingesetzt. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne UNG (Spur C 1-4). Im Gegensatz zur *E. coli*-UNG treten bei der erfindungsgemäßen UNG in den Zeiten 0 bis 4 h nahezu keine Abbauprodukte auf. Bei einer Hitzeinaktivierung für 2 Minuten bei 95°C zeigt die erfindungsgemäße UNG somit einen deutlichen Vorteil gegenüber der UNG aus *E. coli* (Abb. 2A). Die minimale verbleibende Aktivität der erfindungsgemäßen UNG kann durch eine Verlängerung des Inaktivierungsschrittes (z.B. 10 min bei 95°C) weiter gesenkt werden (Abb. 2B).

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE  
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN  
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

## INTERNATIONALES FORMBLATT

Boehringer Mannheim GmbH  
Sandhofer Str. 116  
68305 Mannheim

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,  
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen  
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugewiesenes Bezugszeichen: BMTU 3346	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugewiesene EINGANGSNUMMER: DSM 10239
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
<p>Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde</p> <p>(X) eine wissenschaftliche Beschreibung</p> <p>(X) eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung</p> <p>eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).</p>	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 1995-09-06 (Datum der Ersthinterlegung) <sup>1</sup> eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
<p>Name: DSM-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig</p>	<p>Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:</p> <p><i>J. Werles</i></p> <p>Datum: 1995-09-08</p>

<sup>1</sup> Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.


BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE  
 ...VERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN  
 FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN.

## INTERNATIONALES FORMBLATT

Boehringer Mannheim GmbH  
 Sandhofer Str. 116

68305 Mannheim

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG  
 ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen  
 INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER	II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS
Name: <b>Boehringer Mannheim GmbH</b> <b>Sandhofer Str. 116</b> Anschrift: <b>68305 Mannheim</b>	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: <b>DSM 10239</b> Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung: <b>1995-09-06</b>
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG	
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am <b>1995-09-06</b> geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus  <input checked="" type="checkbox"/> (X) lebensfähig <input type="checkbox"/> ( ) nicht mehr lebensfähig	
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST*	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: <b>DSM-DEUTSCHE SAMMLUNG VON          MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</b> Anschrift: <b>Mascheroder Weg 1b          D-38124 Braunschweig</b>	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:   Datum: <b>1995-09-08</b>

\* Angabe des Datums der Ershinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.  
 \* In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.  
 \* Zutreffendes ankreuzen.  
 \* Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.



### Patentansprüche

1. Thermolabiles Enzym mit Uracil-DNA-Glykosylase-Aktivität erhältlich aus Gramm-positiven Mikroorganismen mit einem Reinheitsgrad von mindestens 95% (SDS-Gel) und Halbwertszeiten von weniger als 5 Minuten bei ca. 40°C und weniger als 2 Minuten bei ca. 45°C.
2. Enzym nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Gehalt an kontaminierenden Fremdaktivitäten kleiner als 2% ist und die spezifische Aktivität mindestens  $5 \times 10^4$  U/mg Protein beträgt.
3. Enzym nach Anspruch 1 oder 2 erhältlich aus Mikroorganismen der Gattung *Arthrobacter* oder *Micrococcus*.
4. Enzym nach einem der Ansprüche 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym aus dem Stamm DSM 10239 isoliert wird.
5. Stabilisierte Lösung des thermolabilen Enzyms mit Uracil-DNA-Glykosylase-Aktivität nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym in einer Mischung bestehend aus 10 bis 250 mM einer im schwach alkalischen Bereich puffernden Substanz, 0,1 bis 5 mM eines Komplexbildners, 0,5 bis 5 mM eines SH-Gruppen stabilisierenden Agenzes, mindestens 100 mM Natriumchlorid, 45 bis 55% (v/v) Glycerin und gegebenenfalls 0,1 bis 5,0 mg/ml Rinderserumalbumin enthalten ist.
6. Stabilisierte Enzymlösung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß ca. 50 mM Hepes/KOH, pH 8,0, ca. 1 mM EDTA, ca. 1 mM Dithiothreitol, ca. 300 mM Natriumchlorid und ca. 50% (v/v) Glycerin enthalten sind.
7. Verfahren zur Gewinnung eines thermolabilen Enzyms mit Uracil-DNA-Glykosylase-Aktivität und einer Halbwertszeit von weniger als 5 Minuten bei ca. 40°C und einer Halbwertszeit von weniger als 2 Minuten bei ca. 45°C aus Gramm-positiven Mikroorganismen, dadurch gekennzeichnet, daß nach Aufschluß der Zellen und Abtrennung von DNA eine Hydroxyapatit-Chromatographie, eine Anionenaustauschchromatographie und eine hydrophobe Chromatographie ausgeführt wird.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA-Abtrennung durch Polymin-Fällung erfolgt.

9. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose ff (high load) erfolgt.
10. Verfahren nach Anspruch 7, 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß der hydrophobe Chromatographieschritt an Phenyl-Sepharose ff erfolgt.
11. Verfahren nach Anspruch 7, 8, 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Grammpositive Mikroorganismus DSM 10239 verwendet wird.
12. Verwendung eines thermolabilen Enzyms mit Uracil-DNA-Glykosylase-Aktivität nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zum Nachweis uracilhaltiger DNA bzw. zur Entfernung der Base Uracil aus DNA, dadurch gekennzeichnet, daß eine Mischung mit uracilhaltiger DNA mit dem Enzym ca. eine Minute bis 30 Minuten bei einer Temperatur von ca. 10°C bis 30°C inkubiert und ca. 1 bis 10 Minuten auf ca. 95°C erhitzt wird.
13. Verwendung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der uracilhaltigen DNA um spezifisch amplifizierte DNA handelt.
14. Verwendung nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß bei Inkubation zwischen ca. 30 Sekunden und vier Stunden bei ca. 4°C keine Aktivität von Uracil-DNA-Glykosylase mehr feststellbar ist.
15. Kit zur Vervielfältigung von spezifischen Nukleinsäuren bzw. entsprechender Fragmente, dadurch gekennzeichnet, daß folgende Komponenten enthalten sind:
  - (a) ein thermolabiles Enzym gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 in einem geeigneten Lagerpuffer,
  - (b) die Nukleotidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dUTP,
  - (c) eine thermostabile DNA-Polymerase und
  - (d) einen im pH-Bereich von 7,5 bis 9,2 puffernde Substanz (Reaktionspuffer).
16. Kit nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß das thermolabile Enzym in einer Konzentration von ca. 0,1 bis 5,0 U/µl vorliegt.
17. Kit nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleotidtriphosphate dATP, dCTP und dGTP jeweils ca. ein Drittel der Konzentration von dUTP ausmachen.

18. Kit nach einem der Ansprüche 15 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß ca. 2 bis 10 U/ $\mu$ l (Endkonzentration) der thermostabilen DNA-Polymerase vorliegt.

19. Kit nach einem der Ansprüche 15 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß der Reaktionspuffer außerdem ca. 10 bis 100 mM Kaliumchlorid und/oder ca. 1,0 bis 5,0 mM Magnesiumchlorid enthält.

Abb. 1

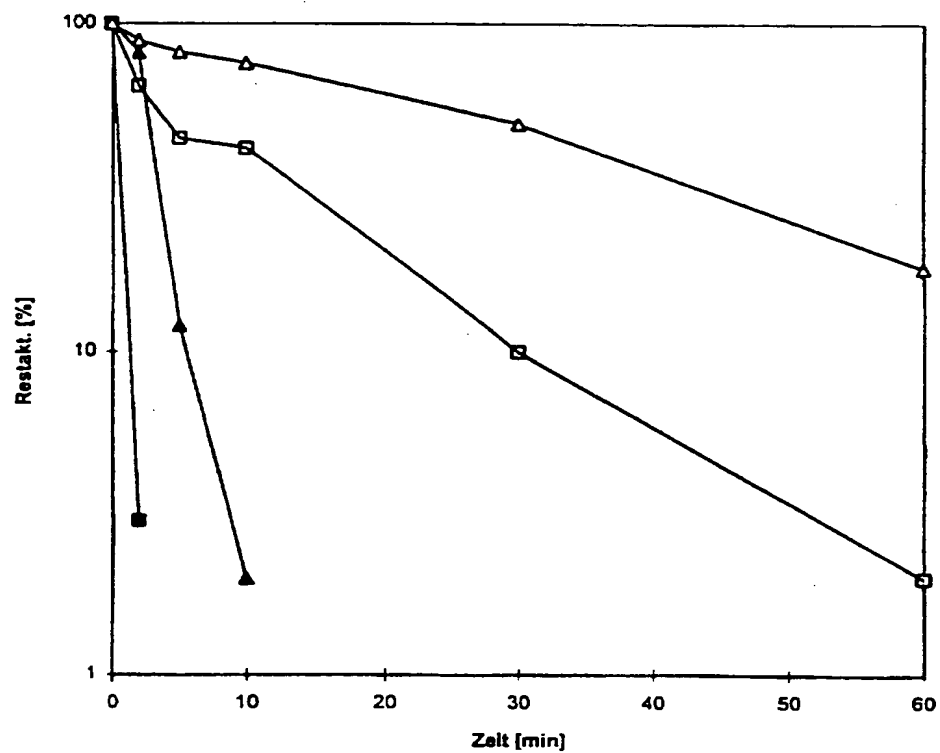


Abb. 2A

2/3

WM 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

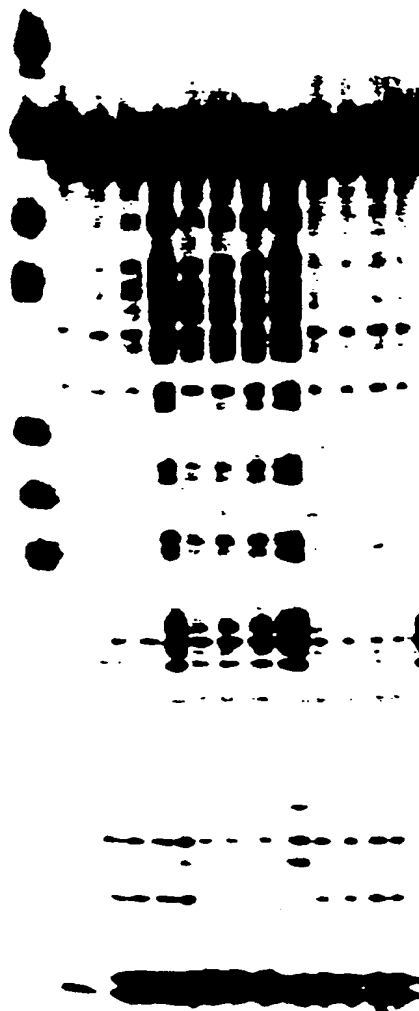
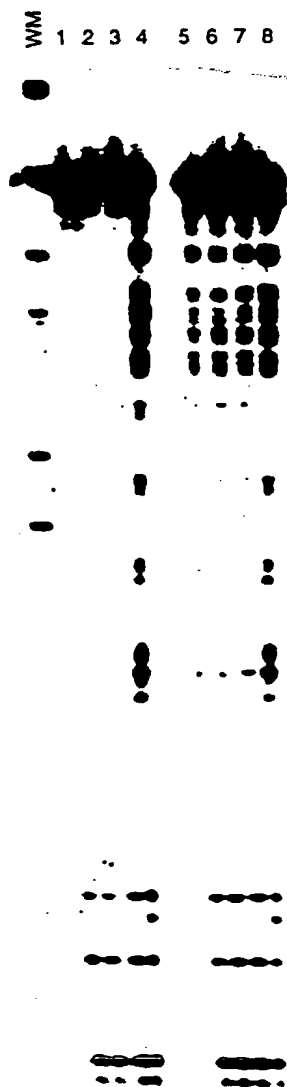


Abb. 2B

3/3



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/EP 96/05398

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/10 C12N9/24 C12Q1/68 C12P19/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C12Q C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 92 01814 A (CETUS CORP) 6 February 1992	1,2, 5-10, 12-19
Y	*see the table in page 21* see the whole document	1,2, 5-10, 12-19
Y	--- BIOCHIM BIOPHYS ACTA, NOV 21 1991, 1097 (4) P299-308, NETHERLANDS, XP000651732 SEAL G ET AL: "Purification and properties of the *uracil* *DNA* *glycosylase* from Bloom's syndrome." see the whole document --- -/--	1,2, 5-10, 12-19

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 April 1997

Date of mailing of the international search report

14.05.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Hillenbrand, G

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. l. Application No.  
PCT/EP 96/05398

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>VIROLOGY, vol. 198, 1994, pages 504-513, XP002029674 MILLNS, A.K. ET AL.: "The vaccinia virus-encoded uracil DNA glycosylase has an essential role in viral DNA replication" see abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 96/05398

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9201814 A	06-02-92	AU 665338 B	04-01-96
		AU 8532791 A	18-02-92
		CA 2087724 A	25-01-92
		EP 0540693 A	12-05-93
		US 5310652 A	10-05-94
		US 5561058 A	01-10-96
		US 5418149 A	23-05-95
		US 5466591 A	14-11-95
		JP 6501612 T	24-02-94
-----			

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/05398

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 C12N15/10 C12N9/24 C12Q1/68 C12P19/34

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C12Q C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 92 01814 A (CETUS CORP) 6. Februar 1992	1,2, 5-10, 12-19
Y	*siehe die Table auf Seite 21* siehe das ganze Dokument	1,2, 5-10, 12-19
Y	--- BIOCHIM BIOPHYS ACTA, NOV 21 1991, 1097 (4) P299-308, NETHERLANDS, XP000651732 SEAL G ET AL: "Purification and properties of the *uracil* *DNA* *glycosylase* from Bloom's syndrome." siehe das ganze Dokument --- -/-	1,2, 5-10, 12-19

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17. April 1997

Abmeldedatum des internationalen Recherchenberichts

14. 05. 97

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tlx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hillenbrand, G

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter nales Aktenzeichen

PCT/EP 96/05398

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>VIROLOGY, Bd. 198, 1994, Seiten 504-513, XP002029674 MILLNS, A.K. ET AL.: "The vaccinia virus-encoded uracil DNA glycosylase has an essential role in viral DNA replication" siehe Zusammenfassung -----</p>	1

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/05398

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9201814 A	06-02-92	AU 665338 B	04-01-96
		AU 8532791 A	18-02-92
		CA 2087724 A	25-01-92
		EP 0540693 A	12-05-93
		US 5310652 A	10-05-94
		US 5561058 A	01-10-96
		US 5418149 A	23-05-95
		US 5466591 A	14-11-95
		JP 6501612 T	24-02-94
-----			